云 南 植 物 研 究 8（2）：193—200，1986
Acta Botanica Yunnanica

脱落酸的酶标免疫测定

季本仁　段金玉

（中国科学院昆明植物研究所）

摘要　使用国产辣根过氧化物酶（HRP）合成酶标记物，用竞争法进行了植物内源激素脱落酸（ABA）的酶标免疫测定研究。测定范围为0.0125 ng—100 ng，在此范围内logit B/B_0与ABA浓度的对数之间呈较好的线性关系。检测的灵敏度达到 5×10^{-14} 克分子。比较了两种酶标记方法对于测定的影响，结果发现直接使ABA共价结合到HRP上形成 ABA-HRP酶标记物比先将ABA与牛血清白蛋白（BSA）结合后，然后进一步再与HRP反应形成ABA—BSA—HRP复合物灵敏度高，非特异性吸附小，而且合成步骤较少。酶标记物的稀释度直接影响测定的灵敏度和浓度对数与logit B/B_0之间的线性关系好坏；在以每毫升 3—6 微克免疫球蛋白包埋免疫吸附板进行测定时，用每毫升 5 微克酶标记物的浓度获得了最佳结果。

关键词　脱落酸；酶标免疫测定；辣根过氧化物酶

植物内源激素脱落酸（ABA）由于与高等植物的一系列重要生理过程如落叶、休眠、气孔运动的调节以及植物对于水分亏缺的反应等密切关联，从而激起植物生理工作者广泛而持久的研究兴趣。[12、7]。Jones[6]根据一系列的试验资料提出，某些植物的内源 ABA 水平，可以作为他们对于环境水分亏缺耐受能力的指标，从而为农业育种人员提供了一种新的筛选手段。因此，无论出于探讨与脱落酸有关的生理过程的需要，还是从实用的目的出发，都要求能对植物组织内源脱落酸的水平进行定量比较分析研究。然而由于植物内源脱落酸含量极低，一般每克新鲜植物组织的含量只有毫微克（ng）的水平，从而增加了测定工作的困难。尽管这样，近几十年来还是陆续发展了一系列的测定方法，这些包括生物测定法、旋光色散、气相色谱与质谱联用以及高压液相色谱等分析方法，特别是色-质联用能检出 1—2 ng 的ABA，使测定灵敏度达到了一定的水平。但是所有以上这些方法都要求在测定之前对植物材料进行高度纯化，手续繁复，并且所需植物材料的量也较多。生物测试法虽不需要这种纯化操作，但由于特异性差，测定往往被植物内源其他的抑制因子所干扰。只是在近几年来，免疫化学方法引入植物微量内源激素的测定之后[4、9、10]，内源脱落酸的分析研究才开辟了一条新的途径，高度的特异性以及高灵敏度往往超过了已有的物理化学方法并大大简化了材料的纯化步骤以及测定程序。Weiler[10]用放射免疫测定脱落酸，检测灵敏度为 0.25×10^{-12} 克分子。后

本文于1985年11月 5 日收到。

来几乎是同时，Weiler[11]和Daie[1]用碱性磷酸酯酶标记脱落酸，进行了脱落酸的酶标免疫测定（ELISA)研究，从而使植物内源激素的测定向高灵敏度、高特异性和快速、简易方向迈出了一大步。但是以上这些作者在进行脱落酸的酶标免疫测定时，使用的是碱性磷酸酯酶（AP）合成酶标记物，只有高活性、高纯度的酶制品才能满足合成酶标记物的需要，这使测定费用较高；此外，当酶制品在高纯度时的不稳定性给贮运带来了一定的困难，这些都在一定程度上限制了这一方法的应用。本文报道了用价格低廉得多的、国内市场易于购得的辣根过氧化物酶（HRP）来合成酶标记物的方法，并用竞争法进行了脱落酸的酶标免疫测定的研究，使测定灵敏度达到 5×10^{-14} 克分子水平，同时对一些影响测定灵敏度的因素进行了探讨。

材料和方法

抗原的制备 ABA分子量小，属于半抗原类型。按照Weiler[10]的方法，用1-乙基-3-（3-二甲基-氨基丙基）碳化二亚胺盐酸盐（EDC）作为交联剂，将外消旋（R，S）-ABA通过它的羧基共价连结到免疫载体蛋白人血清白蛋白（HSA）上（上海生物化学研究所曾庆镒赠送）。合成结束后，用分光光度法测定结合比，大约每个HSA分子能结合17个ABA分子。用这种合成抗原免疫家兔所得到的抗血清，能测定植物体内游离的和结合的脱落酸。

免疫程序 基础免疫用完全福氏佐剂1：3乳化抗原。免疫剂量每只家兔注射300微克。采用真皮内多点注射法[5]，即将2毫升体积的乳化抗原分50点均匀注射于家兔背部真皮内。40天后进行第一次强化免疫注射，抗原量减半，注射方法改为肌肉注射。共进行三次强化免疫注射，每两次注射间隔时间为4—5周。当滴度满意后，一次采血。血清分离后，保存于-18°C冰箱。

酶标记物的合成 用两种方法制备酶标记物。

ABA-BSA-HRP的合成 合成程序是：称取15.8毫克（R，S）-ABA（Fluka），溶于0.8毫升二甲基甲酰胺（DMF）中，然后加入0.4毫升蒸馏水；称取30毫克牛血清白蛋白（BSA）（上海东风试剂厂），溶于1毫升蒸馏水中；以0.2*M* NaOH将pH调到8.5；再称取25.2毫克EDC（Merck）溶于1毫升蒸馏水中。将BSA加到ABA中，并调pH到8.0。然后将EDC溶液分成10等份于90分钟的时间内加到ABA与BSA的混合溶液中，反应过程中不断搅拌。操作结束后暗中室温继续反应17小时，最后对水透析三昼夜。合成的混合液经透析后去除过剩的ABA及介质DMF，用于下一步的合成。称25毫克HRP（上海东风试剂厂。RZ＝3）溶于上述的合成物溶液中，并按最终浓度0.06％加入戊二醛（Fluka），室温搅拌反应2小时后，对pH＝7.2的磷酸盐缓冲盐水（PBS）充分透析，ABA-BSA-HRP复合物合成结束。透析后的酶标记物用50％甘油保存于冰箱内。

ABA-HRP的合成 合成方法与步骤如下：称13.2毫克ABA先溶解于0.5毫升DMF中，再加入0.5毫升蒸馏水，又称取24毫克EDC溶解于0.5毫升蒸馏水中；再称取25毫克HRP先溶解于2毫升蒸馏水中，加入50％DMF溶液4毫升，以0.2 *M* NaOH 调pH到

6.4。这时将EDC溶液滴加到ABA中，反应1小时后，将ABA-EDC反应物按它的体积分成10等份于90分钟内加到HRP溶液中，再在黑暗中继续搅拌反应17小时。合成结束后对pH＝7.2 PBS充分透析。合成物保存方法同ABA-BSA-HRP。

ABA的甲酯化 按De Boer[2]方法合成重氮甲烷乙醚溶液，将标准品ABA或含ABA的样品液溶于一定体积的甲醇后，滴加重氮甲烷的乙醚溶液，使微微过量而呈黄色，通入高纯度氮气驱除过剩的重氮甲烷。ABA的标准样品的浓度为0.0125 ng—500 ng/50微升，甲酯化后形成ABA-Me。

免疫球蛋白的分离和纯化 按Hurn[5]等的方法分离纯化免疫球蛋白。本文实验所用的球蛋白都是经DEAE-纤维素柱层析纯化的，经Sephadex G-25脱盐后用50%甘油保存于冰箱内。

酶反应活力的检测 样品与酶标记物同时加到已被抗ABA免疫球蛋白包埋的吸附板上进行竞争结合后，加入酶反应基质检测酶活力[3]。基质溶液为40毫克邻苯二胺溶于100毫升pH5.0、0.1M柠檬酸-盐酸缓冲液，加入30%双氧水40微升。用4 M H_2SO_4中止反应后，于波长492 nm处在微量分光光度计上测光密度。

植物材料的提取 植物材料称重后用液氮冰冻、粉碎，以含有1毫克/毫升丁化羟基甲苯（BHT）的80%甲醇浸泡2昼夜，提取两次，每克鲜重20毫升提取液，过滤，减压蒸干。加入相当于一半抽提体积的甲醇，用重氮甲烷甲酯化，蒸干。以PBS定容，经适当稀释后测定。

免疫测定的步骤和设备 酶标免疫测定的大部分步骤是在聚苯乙烯塑料吸附板上完成，实验中所使用的是40孔板（上塑三厂）。光密度测定用微量分光光度计进行（新安江分析仪器厂）。测定的全过程如图1所示。

结果和讨论

抗ABA免疫球蛋白（IgG）的特性以及测定的范围和精确度

我们经免疫家兔并分离得到纯度较高的抗ABA IgG，实验中用3—6微克/毫升的包埋浓度包埋免疫吸附板，测定的灵敏度和测定的浓度范围都是令人满意的。按血清稀释度计算相当于血清稀释1,100—2,200倍。每只家兔所得到的血清约可供20至25万个样品测定之用。

图2和图3表示ABA-Me标准曲线酶标免疫测定所得数据的两种处理方式。多次测得的数据经计算得logit B/B_0值对ABA-Me浓度对数的回归系数约为-1.4左右，而两者的相关系数大约在0.970左右。由此可见100 ng—0.0125 ng跨越4个数量级的浓度范围内有较好的线性关系。测定最低检出量为0.0125 ng，相当于5×10^{-14}克分子，这个检测灵敏表与迄今已报道的放射免疫测得的最低检出量2.5×10^{-13}克分子相比毫不逊色。

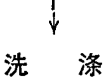
不同酶标记方式和标记物浓度对测定结果的影响

实验中比较了两种酶标记物即ABA-BSA-HRP及ABA-HRP在ELISA中的表现。从所测得的ABA-Me剂量反应曲线来看，两种标记物当用同样的酶浓度，在相同的测

包 埋

抗ABA免疫球蛋白以pH＝9.6碳酸氢钠缓冲液稀释后，

每孔加入300微升，4℃孵育18小时。



洗 涤

倾出包埋溶液，以PBS-Tween 20液洗涤三次。



阻断吸附

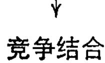
用0.1% BSA的 PBS-Tween 20溶液阻断吸附，

每孔加入300微升，使BSA分子填充未被球蛋白占据的表面。



洗 涤

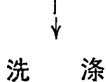
倾出阻断吸附液，以PBS-Tween 20洗三次



竞争结合

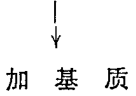
每个样品孔先加入200微升PBS，再加入50微升含ABA的样品或

ABA的标准品，然后加50微升酶标记物，室温放置1小时



洗 涤

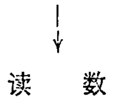
倾出竞争结合的酶及样品液，以PBS-Twcen20洗三次



加 基 质

每个样品孔加入基质溶液200微升，37℃孵育40分钟后，

以4 *M* H_2SO_4中止反应



读 数

用微量分光光度计，于波长492 nm处测光密度

图1. ABA酶标免疫测定流程图

Fig. 1. Flowchart of ABA ELISA procedures.

定条件下，用ABA-BSA-HRP进行测定时，在每一个不同ABA-Me的浓度的B/B_0%值都高于ABA-HRP所得到的值，这一点在图4可以清楚地看出，尤其在高浓度范围内更为明显。这种现象的出现如果考虑到ABA-BSA-HRP复合物具有与免疫家兔时所使用的合成全抗原ABA-HSA极其相似的抗原决定簇时，便比较易于理解了。然而ABA-BSA-HRP所表现的对于包埋在吸附板的特异抗体较高的亲和力，并没有由此而提高测定的灵敏度，相反，从表1可以看出，ABA-HRP用几种不同的浓度所得到的抗原浓度对logit B/B_0 的回归系数都比同样酶浓度的ABA-BSA-HRP要高，而前者平均是后者的

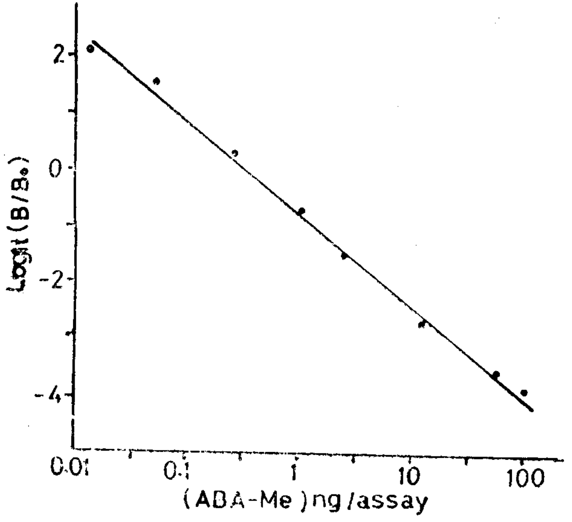


图2.　ABA甲酯酶标免疫测定线性标准曲线
$B = A_B - A_{UB}$，$B_0 = A_{B_0} - A_{UB}$，logit $B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{100 - B/B_0}$，$A_B$指某一浓度标准样品在492nm处的光密度。$A_{UB}$是加入过量ABA时的光密度值。$A_{B_0}$是不加 ABA 标准品或样品，只加蒸馏水时的光密度值。每一浓度重复三次。平均误差 3 %。

Fig. 2. Standard curve for the ABA solid phase enzyme immunoassay in the linearized form. The standard was the ABA methyl ester. A_{UB} was the absorbance in the prensence of a large excess (500 ng) of ABA. A_B was the absorbance at 492 nm in the presence of a known amount of ABA. A_{B_0} was the absorbance in the absence of ABA. It was in triplicate for each of the determination of ABA concentration. Average error was 3 %.

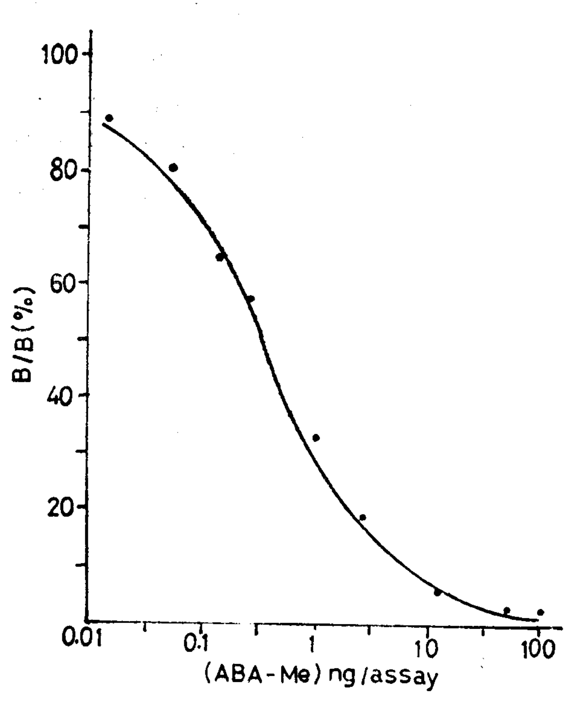


图3.　ABA甲酯免疫酶标测定S形标准曲线。

$$B/B_0\ \% = \frac{A_B - A_{UB}}{A_{B_0} - A_{UB}}$$

Fig 3. Standard curve for the ABA solid phase immunoassay in the sigmoidal form.

表1.　用ABA-HRP和ABA-BSA-HRP在酶标免疫测定中所得到的一些参数的比较

Table 1. The comparison of some parameters obtained in ELISA between ABA-HRP and ABA-BSA-HRP

酶标物 labeled enzyme	参数 parameters: 回归系数byx* n = 8 regegression coefficient					平均B/B_0%** average B/B_0					A_{UB}				
	平均	E_5***	E_6	E_7	E_8	平均	E_5	E_6	E_7	E_8	平均	E_5	E_6	E_7	E_8
ABA-BSA-HRP	-1.45	-1.00	-1.02	-1.44	-1.75	56.3	55.8	61.7	48.4	59.5	0.586	0.563	0.695	0.623	0.466
ABA-HRP	-1.81	-1.58	-1.68	-1.72	-2.27	40.1	44.2	48.2	38.6	29.5	0.043	0.022	0.039	0.032	0.079

* byx指logis B/B_0对ABA-Me浓度对数的回归系数。
* * 指已知不同浓度的ABA-Me所得到的B/B_0%的平均值。
* * * E_5—E_8为酶浓度(enzyme concentration)：$E_5 = 20.8$ μg/ml，$E_6 = 10.4$ μg/ml，$E_7 = 5.2$μg/ml，$E_8 = 2.6$μg/ml
* byx is the regression coefficient of logit B/B_0 to ABA-Me concentrations in logarithm.
* * Average B/B_0 is the averaged value on differennt concentrations of ABA-Me.

1.2倍。这表明在同样测定条件下 ABA-HRP的灵敏度要高于 ABA-BSA-HRP，图 5 比较直观地说明这一点。另外从表 1 还能看出用ABA-BSA-HRP测定时的A_{UB}值远高于相同酶浓度的ABA-HRP所测得的A_{UB}值，A_{UB}值是指当加入远远过量的半抗原 ABA-Me 时，被结合在吸附板上的标记酶所表现的活力，这个参数反映了非特异性吸附的大小，因此用 ABA-BSA-HRP 作为标记物进行测定时，非特异性吸附是明显的。

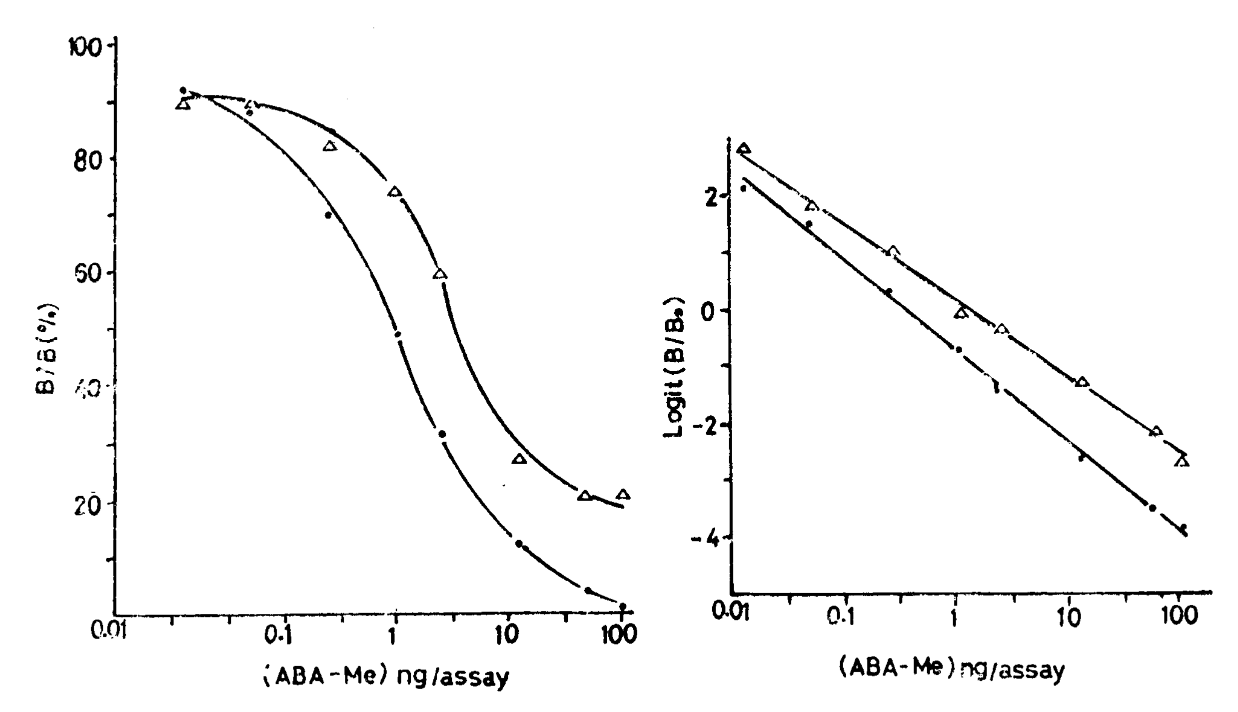


图4. 用ABA-HRP和ABA-BSA-HRP 两种酶标记物测得的标准曲线的比较

Fig 4. The comparison between two standard curves in the sigmoidal form obtained by use of ABA-HRP and ABA-BSA-HRP as the enzyme conjugates.

• ABA-HRP; △ABA-BSA-HRP.

图5. 用ABA-HRP和ABA-BSA-HRP 两种酶标记物测得的线性标准曲线的比较

Fig 5. The comparison between two standard curves in the linearized form obtained by use of ABA-HRP and ABA-BSA-HRP as the enzyme conjugates.

• ABA-HRP; △ABA-BSA-HRP.

ABA 甲酯化以及使用不同酶标记物浓度对测定结果的影响

试验表明ABA经重氮甲烷甲酯化后显著地增加了与包埋特异抗体的结合能力，从而也提高了测定灵敏度，用ABA作为标准样品，在最佳的实验条件组合的情况下，最低检测量是0.05 ng，而对于ABA-Me为0.0125 ng。在几个不同的酶标记物浓度ABA-Me所测得的回归系数的绝对值都大于ABA，前者约为后者的1.8—2.0倍。

至于酶的稀释度对于测定的精确度和灵敏度的影响更是十分明显（图 6）。当包埋条件固定以后，随着酶稀释度的增加，测定灵敏度有随着增加的趋势（表 1）。但是酶标记物稀释度与反映线性关系的参数——相关系数(γ)之间的关系却不同。酶稀释度过高或是过低都导致γ值降低，只有通过试验找到适当的抗体包埋浓度与酶标记物的浓度组合，才能得到最大的γ值。在我们实验条件下，一般说来如果用每毫升 3 — 6 微克的

IgG 包埋吸附板，那末用5微克/毫升的酶标记物浓度能得到最理想的测定结果。

植物材料中脱落酸的检测及回收率试验

取生长于露地的云花一号小麦孕穗期的旗叶为材料，室温气流快速部分脱水之后，测定内源脱落酸水平的变化。ABA的回收试验也用对照叶片进行。测定结果表明，旗叶对照叶片中ABA的含量为220 ng/g 鲜重。回收率平均为104％±7。小麦叶片经室温20分钟脱水到原鲜重的82％时，脱落酸的含量按原鲜重计算迅速由对照水平增加到340 ng/g鲜重，这与已报道的结果在趋势上是一致的。

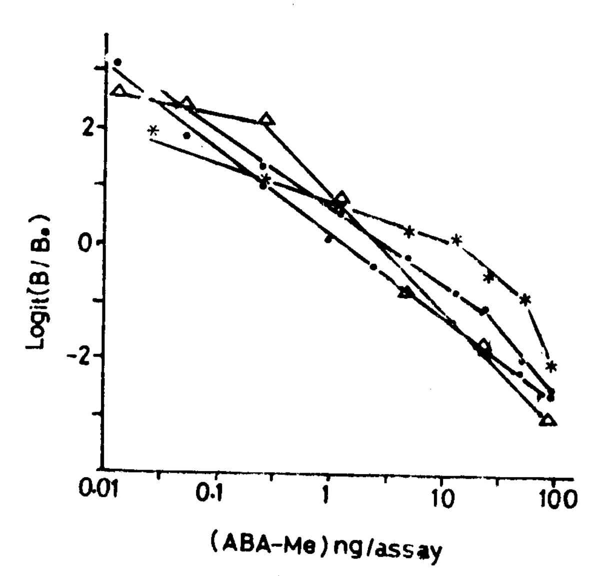


图6. 不同浓度的酶标记物对标准曲线的影响 用ABA-BSA-HRP为标记酶

Fig 6. The effect of different concentrations of labled enzyme on standared curves. The enzyme conjugate was ABA-BSA-HRP.
-△-△-△- 2 μg/ml; -o-o-o- 20μg/ml; -*-*-*-80μg/ml; -•-•-•-5 μg/ml

小结　采用低剂量皮内多点注射以及选择适当的免疫间隔时间这样一种免疫程序，实验证明能获得针对 ABA 亲和力很好的抗体。Daie 等在用ELISA 测定ABA时，使用的酶标记物是 ABA-BSA-AP复合物。当我们用 HRP 合成酶标记物时，并没有看到这种类型的酶标记物比直接将半抗原结合到 HRP 上有多少优越之处，相反用ABA-HRP作为酶标记物具有合成简单，非特异吸附小、灵敏度高的特点。此外，把选择适当的抗体包埋浓度和标记物稀释度等这些条件结合起来，可以使测定达到相当高的灵敏度和精确度。ABA 酶标免疫测定的效率在我们实验室的条件下，每个工作日可以完成80个样品三次重复的工作量。同时因为抗体包埋浓度低，酶标记物稀释度高成本低廉，一般实验室的设备条件都能满足需要，把以上这些因素综合起来考虑，ABA 的酶标免疫测定方法在快速测试大量植物样品方面，有着其他物理化学方法所无法比拟的优点。

参考文献

〔1〕 Daie, J. & R. Wyse, 1982: *Annal. Biochem.*, 119:365—371.

〔2〕 De Boer Th. J. & H. J. Backes, 1954:*RECUEIL* 73:229—234.

〔3〕 Engvall E., 1980: Methods of Enzymology Vol. 70, 419—438. Academic Press, New York.

〔4〕 Fuchs, Y., S. Mayak, S. Fuchs, 1972: *Planta* 103:117—125.

〔5〕 Hurn, B. & M. Chantler, 1980: Methods in Enzymology vol. 70:104—142, Academic Press, New York.

〔6〕 Jones, H. G., 1978: *Nature*, 271:610.

〔7〕 Milborrow, B. V., 1974: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:259—307.

〔8〕 Quarrie S. A., 1982: Plant Growth Substances (P. F. Wareing, ed.) : 609—619. Academic Press. New York.

〔9〕 Weiler, E. W., M. H. Zenk, 1976:*Phytochemistry*, 15:1537—1545.

〔10〕 Weiler, E. W. 1979: *Planta*, 144:255—263.

〔11〕 Weiler E. W. 1982: *Phsiol.Plant*, 54:510—514.

〔12〕 Wright S. T. C., 1978:Phytochormones and related compounds: a comprehensive treatise Vol. 2, (D. S. Letham ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. New York.

AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR ABSCISIC ACID

Ji Benren and Duan Jinyu

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract We have developed an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative analysis of abscisic acid (ABA) by coupling horseradish peroxidase(HRP)to ABA directly as an enzyme conjugate. The sensitivity of the assay, 50 f mol, is comparable to the radioimmunoassay and the established methods using alkaline phosphatase (AP) -ABA or ABA-bovineserum albumin-AP as the enzyme conjugate. The logit B/B_0 value was linear between 12.5 pg to 100 ng. For improving assay sensitivity and precision, we have also approached some experimental conditions including the selection of proper immunization schedules, injection doses and route, enzyme conjugate concentration and the dilution of antibody against ABA.

Key words ABA; ELISA; HRP